

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-110704

(43)Date of publication of application : 28.04.1997

(51)Int.Cl.

A61K 35/74

A61K 35/74

A61K 35/74

A61K 9/08

A61K 39/085

(21)Application number : 07-297548

(22)Date of filing : 19.10.1995

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES INST

(72)Inventor : SASAKI TAKUMI

IDE TOSHIO

MORIYAMA TAKESHI

KOMORI KENJI

IMAGAWA YOSHITAKA

TOKIYOSHI YUKIO

(54) ORAL PREPARATION FOR PREVENTING AND TREATING IMMUNOPATHY DISEASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an oral preparation for preventing and treating immunopathy diseases such as rheumatoid arthritis or ulcerative colitis containing Staphylococcal-enterotoxins or their derivatives and is useful in preventing and treating these diseases.

SOLUTION: This oral preparation contains Staphylococcal-enterotoxins or their derivatives, preferably in an amount of 0.02-0.5 μ g each dose. The enterotoxins are preferably purified at such a level that it shows a single band in the gel electrophoresis. As the enterotoxins, is preferably cited Staphylococcus aureus enterotoxins B, A, C1, which bond to the V β T-cell antigen receptor. A liquid preparation in which the toxins or their derivatives are dissolved in physiological salt solution is preferred as an preparation form. The oral dose is 0.05-0.5 μ g/day on the basis of the enterotoxins and preferably given once or twice a day.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

23.08.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-110704

(43) 公開日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/74	ABA		A 6 1 K 35/74	ABAG
	ABF			ABF
	AGA			AGA
9/08			9/08	E
39/085	ACJ		39/085	ACJ
審査請求 未請求 請求項の数6 FD (全 11 頁)				

(21) 出願番号 特願平7-297548

(22) 出願日 平成7年(1995)10月19日

(71) 出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所
熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

(72) 発明者 佐々木 巧

熊本県熊本市石原町301-72

(72) 発明者 井手 敏雄

熊本県菊池郡菊陽町原水5900-441

(72) 発明者 森山 毅

熊本県熊本市武蔵ヶ丘4丁目18公団1-602

(72) 発明者 小森 健治

熊本県熊本市長嶺町460-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤

(57) 【要約】

【目的】 慢性関節リウマチおよび潰瘍性大腸炎等の免疫異常性疾患に対する新規な予防治療用経口投与剤を提供することを目的とする。

【構成】 高度に精製されたS E群外毒素を主要構成成分とし、必要に応じゼラチン、塩、糖またはアミノ酸などの好適な安定化剤、賦形剤を添加する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫異常性疾患の予防治療に有効量のS E群外毒素(Staphylococcal enterotoxins、以下S E sと称することがある)もしくはその誘導体を含有する免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【請求項2】 含有されるS E sもしくはその誘導体が、ゲル電気泳動において単一バンドを示す程度に精製されていることを要件とする請求項1記載の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【請求項3】 1回投与当り0.01~50 μ g、好ましくは0.02~0.5 μ gのS E sもしくはその誘導体を含有する請求項1もしくは請求項2に記載の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【請求項4】 S E sが、V β T細胞抗原受容体(以下、V β TCRと称することがある)に結合性を有する、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンC1(SEC1)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンC2(SEC2)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンC3(SEC3)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンD(SE4 20 ED)、黄色ブドウ球菌エンテロトキシンE(SEE)およびこれらの誘導体より成る群から選ばれる物質である請求項1~請求項3のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【請求項5】 生理学的に許容し得るpHおよび許容し得る強度のイオン強度を有する水溶液である請求項1~請求項4のいずれかに記載の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【請求項6】 生理学的に許容し得る強度を溶液に与えるに充分な量で、炭水化物、糖、糖アルコールおよびアミノ酸より成る群から選ばれる物質を含有する請求項5記載の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本願発明は、新規な免疫異常性疾患予防治療用薬剤に関する。さらに詳細には、S E群外毒素(Staphylococcal enterotoxins、以下S E sと称することがある)もしくはその誘導体を本態とする慢性関節リウマチあるいは難治性炎症性腸疾患等のアレルギー疾患、免疫異常性疾患予防治療用の経口投与薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】 慢性関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis、以下RAと称することがある)等の臓器非特異的自己免疫疾患並びに潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis、以下UCと称することがある)あるいはクローン病のような難治性炎症性大腸炎等の臓器特異的自己免疫疾患は、通常は免疫学的寛容の状態にある自己の抗原に対して応答するT細胞が、何らかの原因で自己の組織内で活性化され自己の抗原と 50

応答するようになり、これが持続的な炎症反応となって組織に障害を与えることに起因する。この場合、抗原は自己の関節の構成成分であるII型コラーゲンや消化管粘膜の構成成分である。これらの疾患の患者数は毎年微増の傾向にあるにもかかわらず、有効な治療薬や予防治療方法は見出されていない。現在これらの疾患の治療には、サラゾピリン、5-アミノサリチル酸、アザチオプリン、6-MP、胸腺摘出術、トラニラスト、7S-免疫グロブリン大量療法、成分栄養、シクロスポリンAおよびメトロナゾール等の免疫抑制剤の薬物療法が対症療法的に行なわれている。しかしながら、これらは根治的な療法とは言えず、むしろ長期運用による重篤な副作用の原因ともなり、より有効な予防治療薬・治療法の開発が望まれている。

【0003】 S E sは、1989年、White J.らによって発見された細菌性スーパー抗原である(White J. et al., Cell, 56, p27-35, (1989))。通常の抗原が、抗原提示細胞に取り込まれクラスII主要組織適合遺伝子複合体(Major Histocompatibility Complex、以下MHCと称することがある)と複合体を形成した状態でT細胞上のT細胞抗原受容体(T Cell Antigen Receptor、以下TCRと称することがある)に認識され、しかもその認識はクラスII MHCのハプロタイプに限定される(これをMHC拘束性という)のに対して、スーパー抗原はクラスII MHC分子にハプロタイプに関係なく結合し、さらに特定のTCRの β 鎖可変領域(V β 鎖)に結合する。このような結合が生じると、スーパー抗原が結合したT細胞は一時的に活性化され分裂増殖を引き起こし、炎症性のサイトカインを産生する。

【0004】 スーパー抗原を新生マウスに静脈内あるいは腹腔内投与すると、これに応答するV β TCRを持ったT細胞亜集団が除去され、同じスーパー抗原に対して応答しなくなるトレランスの状態になる。一方、成体のマウスに投与した場合、そのスーパー抗原に結合するV β TCRを持つT細胞が再びスーパー抗原の刺激に対して応答しなくなる状態、即ちアナジの状態が誘導されトレランスになる。このようなスーパー抗原の特徴は通常の抗原の認識とは異なっている。

【0005】 ところで、S E sはスーパー抗原としての機能を有する一方で、ブドウ球菌の食中毒を起こす毒素エンテロトキシンでもある。エンテロトキシンとしての病原性は、エンテロトキシンが消化管内へ入ったのち腸管へ取り込まれることによって発現される。症状としては悪心、吐き気、下痢、発熱および筋肉痛などが含まれるが、このうちのいくつかは、スーパー抗原によって活性化されたT細胞や抗原提示細胞から急激にかつ大量に生じる炎症性のサイトカインを介して発現されると考えられている。事実、S E sの一種である黄色ブドウ球菌エンテロトキシンB(Staphylococcal Enterotoxin B、以下SEBと称することがある)を静脈内投与した場

合、食中毒と同様の症状が観られたことが報告されている(Seminars in Immunology, 5:3, (1993))。in vivo で投与した場合、最初にこのようなT細胞及び抗原提示細胞の活性化が起こり、結果的に体重減少などの症状が認められ、1~2週後にトレランスが成立する。トレランスが成立した動物では、再び同じエンテロトキシンの侵入があっても食中毒様の症状は認められない。このようにスーパー抗原は生体内に投与された場合、いったんT細胞や抗原提示細胞を活性化して炎症を惹起した後トレランスを誘導する。

【0006】特定の $V\beta$ TCRを持つT細胞にトレランスを誘導するという性質は、ある種の免疫学的疾患、特にI型アレルギー性疾患や自己免疫疾患の予防もしくは治療に応用できる可能性を示唆している。事実、疾患モデルマウスの系を用いてSEBを投与することで発症抑制が可能になったという報告がなされている。Kim Cらは、全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus、以下SLEと称することがある)のモデルマウスであるMRL/lprマウスのループス腎炎がSEBを予め投与しておくことにより発症を抑制できることを報告した(J. EXP. Med., 174, p. 1131, (1991))。また、Rott O.らは実験的アレルギー性脳脊髄膜炎(Experimental Allergic Encephromyelitis、以下EAEと称することがある)の系で前もってSEBを投与し、SEB応答性の $V\beta 8$ TCRT細胞をトレランスにしておくことで発症が抑制できたことを報告した(Int. Natl. Immunology, 4:p. 347, (1991))。これらの結果は、SEBをワクチン的に用いることで特定の自己免疫疾患の発症を予防できる可能性を示唆するものである。

【0007】しかしながら、これらの実験ではSEBの投与方法は静脈内もしくは腹腔内であり、投与量も1匹当たり100 μ g前後とかなり多い。このような投与量ではマウスに対して無視できない程度の病原性をもたらすことは必至であり、このままヒトの疾患に応用することは不可能である。また、現状では免疫異常性疾患にはその発症の可能性を予見させる様な診断法はなく、従って発症を予防できるような方法はない。一方、免疫異常性疾患の患者数はここ5年間を見ても殆ど減少せず、また患者の大半は労働可能な若年層から中年層に多く、社会的に重大な問題となっている。スーパー抗原によって誘導されるトレランスは、前述した免疫抑制剤がリンパ球全般もしくはT細胞またはB細胞に作用し広範な免疫抑制を引き起こすのに対して、特定の $V\beta$ 亜集団を持つT細胞にのみ作用する。従って、失われる免疫応答は限られた範囲(約1~15%)に留まるので、免疫抑制剤を使用した場合のように免疫応答全般が失われることは少なく、原因となっているT細胞のみを標的とした原因療法に近い方法になり得るものである。しかしながら、スーパー抗原の大量投与は、前述のごとく一時的なT細胞や抗原提示細胞の活性化を引き起こし、体内に急激な

炎症状態を惹起するという毒性の問題点がある。本願発明は、従来のスーパー抗原投与の問題点を克服し、免疫異常性の疾患、特にI型アレルギー、RAやUCを始めとする難治性炎症性腸疾患の予防もしくは原因療法的治療薬を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本願発明は前述した問題点を解決するもので、本願発明者が免疫異常性の疾患、特にRAのような臓器非特異的自己免疫疾患、UCやクローン病のような難治性炎症性腸疾患を予防及び治療する手段を提供すべく鋭意研究を重ねた結果達成されたものである。まず、本願発明者らは、SEBに代表されるSEsが腸管に到達したときに病原性が発現され、しかもその病原性はスーパー抗原活性を介していることに着目し、SEBを経口的に投与することでスーパー抗原活性の1つであるトレランスの誘導が可能かどうか検討した。鋭意研究の結果、高度に精製したSEBを病原性を与えない投与量で連続的に長期間経口投与することにより、より有効にトレランスを誘導し得るという知見を見だし、この知見に基づいて、高度に精製したSEBを本態としこれを少量含有する新規な免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤を供する本願発明を達成するに至った。本願発明の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤を用いた場合、生体に病原性を与えることなくトレランスのみ有効に誘導することができる。従って、前述したI型アレルギー性疾患や自己免疫疾患の予防だけでなく治療にも応用できる可能性が考えられ、原因療法的免疫異常性の疾患の予防及び治療用薬剤としての新たな有用性が開拓された。

【0009】すなわち、本願発明は、RAやUCのような疾患を持つ患者の原因となっているT細胞にトレランスを誘導し得る高度に精製されたSEsもしくはその誘導体を本態とする経口投与薬剤に関するものである。本願発明でもたらされる経口投与用薬剤を使用した場合、免疫抑制剤を投与した時に観られる広範な免疫抑制、例えばT細胞のマイトジェンに対する増殖応答の低下、B細胞のマイトジェンに対する増殖応答の低下、特定の抗原に対する増殖応答の低下は認められない。しかしながら、RAやUCの発症に関与すると考えられる $V\beta 8$ TCR陽性T細胞にトレランスを誘導することができる。 $V\beta 8$ TCR陽性T細胞は、他の疾患、例えば前述したEAEやSLEにも関与していることが指摘されているので、これらの疾患に関連しているT細胞にトレランスを誘導することも可能である。

【0010】本願発明によれば、静脈内や腹腔内にスーパー抗原として機能し得るSEsを投与することによって引き起こされる病原性、例えば10~20%に及ぶ体重減少は認められない。すなわち、このような病原性の原因となっている全身に及ぶT細胞及び抗原提示細胞としてのマクロファージあるいはB細胞の急激な活性化、

それに伴う炎症性のサイトカイン例えば、IL-1、IL-2、IL-4、TNF- α 、TNF- β 、INF- γ 等の大量の産生が認められないので細菌性スーパー抗原の有する病原性を生体に影響を及ぼさないレベルまで著しく低減することを可能にする。

【0011】本願発明の免疫異常性疾患予防治療用の経口投与用薬剤は、その本態として高度に精製された上述のSEsもしくはその誘導体を他の投与形態の薬剤に比較して極めて少量含有することを特徴とする。薬剤の本態として、好適な態様であるSEBに限らず他のV β TCR結合性を持つ細菌性スーパー抗原、例えばSEA、SEC1、C2、C3、D、E等の他のSEsを使用した場合についても同様の効果をもたらすものである。また、それらの誘導体も好適に使用し得る。つまり、これらは他のV β TCRを持つT細胞亜集団に特異的にトレランスを誘導する。本願発明に使用されるSEsを調製する方法は特に限定されていないが、例えばSEsを産生する細菌を培養しその培養上清より分離調製する方法あるいは遺伝子組換え技術により得たSEs産生細胞より分離する方法などによって調製することができる。

【0012】例えば、本願発明の薬剤の本態となるSEsの好適な態様であるSEBは以下の方法で調製することができる。Staphylococcus aureus 243株の培養上清から調製する方法について述べると、まず、4%NZアミン、0.01%塩酸チアミン、0.0005%ニコチン酸を含む培地中で同菌株を好氣的に24時間培養し、遠心分離によって菌体を除去し培養上清を調製する。得られた培養上清を、本願発明者によって独自に作製された抗SEB単クローン抗体を固相化した担体を充填したカラムに通液し、洗浄後、4M塩化マグネシウムあるいは3Mチオシアン酸ナトリウム溶液で溶出する。溶出液を生理食塩水中に2回透析した後、さらにリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffer saline、以下PBSと称することがある)に2回透析する。透析後得られた画分をタンパク質の濃度を測定した後、0.45 μ m径のメンブレンフィルターを用いて無菌濾過する。この濾液を一定量ずつ分注することでSEBを調製する。また、遺伝子組換え技術を用いてSEsを調製する方法としては、例えばJones C. L. 等によって報告された方法がある(Jones C. L. and Khan S. A., J. Bacteriol., 1(1), p. 29-33, (1986))。また、遺伝子組換え技術を用いた点突然変異(point mutation)を導入することで、SEsのより好ましい分子型を創製することも可能である。

【0013】調製されたSEsの活性を最大限に維持するために、本願発明のSEsは新鮮であるか、4 $^{\circ}$ Cで保存する場合には保存後約5日以内のものが好ましい。あるいは、本願発明のSEsは、ゼラチン、塩、糖、糖アルコールまたはアミノ酸などの好適な安定化剤と共に凍結乾燥もしくは液体の状態で保存することができるし、さらには、SEs溶液を凍結し保存することも可能であ

る。本願発明では、かかる有効成分としてのSEsもしくはその誘導体と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤とすることができる。本願発明の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤の本態となるSEsもしくはその誘導体は高純度のものが要求され、例えば少なくともゲル電気泳動において単一バンドを示す程度に精製されていることが望まれる。この意味から、市販の標品をそのまま使用することは好ましい態様ではない。また、薬剤の性質上、本態に夾雑する内毒素(エンドトキシン)が除去されていることが要求される。本薬剤の最終的な剤型については、経口投与用の薬剤である限り特別の制約はなく粉末(固形)状、溶液状あるいはシロップ状のものが考慮され得る。例えば、SEsもしくはその誘導体を適当な賦型剤、例えば炭水化物、糖、糖アルコールおよびアミノ酸等と共に凍結乾燥し固形状としたものまたはSEsもしくはその誘導体を生理食塩水および許容し得る強度のイオン強度を有する適当な緩衝液中に溶解した液状製剤等は好適な態様である。また、本態となるSEsもしくはその誘導体を市販の飲料水に溶解し経口的に摂取することも考えられ得る。薬剤中の含量については、SEsの毒素としての特性を考慮し低用量に抑えることが要求されこれを満足する量且つ薬効が発揮される用量、例えば1回の投与当り0.01~50 μ g、好ましくは0.02~0.5 μ gの本態を含有する薬剤が好適である。

【0014】本願発明の高度に精製されたSEsもしくはその誘導体を本態とする免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤の有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動するものであるが、例えばSEsに換算した場合、一般に成人一日当り0.05~5 μ gであり、好ましくは0.05~0.5 μ gを1~2回に分けて経口的に投与するのがよい。また、場合により例えばアザチオプリン、シクロフォスファミド、またTNF α 抗体等の高分子の抗炎症剤等の他の薬剤と併用することも可能である。

【0015】本願発明の経口投与用薬剤を免疫異常性の疾患の予防及び治療に使用する場合、以下のような機構が想定され得る。本願発明の薬剤の本態であるSEsは、もともとプロテアーゼによる加水分解に耐性で、投与された該タンパク質の一部は小腸もしくは大腸にまで到達すると考えられる。その後、腸管の粘膜を通じて排出リンパ管や門脈に吸収され、肝臓を経て体循環に入り全身を循環するようになる。その過程でMHC class II分子陽性細胞に結合し、さらに特定のV β TCR陽性T細胞に結合する。V β TCR陽性T細胞は一過性に活性化された後に抗原刺激やレクチン刺激に対して応答しない状態即ちトレランスになる。SEsの投与が20回以上になるとトレランスになったV β TCR陽性T細胞も

10

20

30

40

50

増加し、in vitro の測定系での測定が可能になる。ところで、RAモデルマウスではV β 8TCR陽性T細胞が疾患の発症に関与していることが知られている。そこで、このモデルマウスにSEsを予め経口的に投与しV β 8TCR陽性T細胞をトレランスにしておくと、その後疾患を発症させるためのコラーゲン免疫を行なっても疾患は全く発症しないかあるいは発症しても軽度であると思われる。即ち、RA疾患が予防される。また同様の効果はUCモデルマウスでも認められる可能性がある。一方、一旦疾患を発症させたマウスに経口的にSEsを

【0016】

【本発明の作用並びに効果】本願発明の薬剤の本態であるSEsもしくはその誘導体は、経口的に投与された場合腸管を通じて体内へ取り込まれ、特定のV β TCR陽性T細胞と結合しこの細胞にトレランスを誘導する。トレランスは正常な免疫反応の一つで抗原特異的である。スーパー抗原によって誘導されるトレランスは特定のV β TCR特異的であるので、スーパー抗原が結合したT細胞のみにトレランスが誘導されるが、結果としてこれらのT細胞が特異性を持つ抗原に対しても応答しなくなる。この抗原が免疫異常性の疾患に関連する抗原であった場合、その抗原に対する応答性は失われることになる。また本願発明では生体に影響を及ぼさない投与量でSEsを長期間連続的に投与し、緩やかにかつ最大限にトレランスを誘導するので、一旦成立したトレランスは少なくとも数ヶ月間は持続する。このような特徴は慢性化し、疾患が終生持続するような免疫異常性の疾患、特に自己免疫疾患の予防や治療において正常な細胞を標的として含まず、できるだけ疾患に関与する細胞を標的とした画期的な方法であり、原因となっている細胞のみを標的とした理想的な方法に飛躍的に近づくものである。また、対象疾患も自己免疫疾患に限らず、I型アレルギーの様な特定のT細胞の特定の外来抗原に対する過敏反応が発端で起こる抗体仲介性の疾患にも有効であると考えられる。

【0017】以下、本願発明を実施例に基づき詳細に説明するが、本願発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0018】

【実施例】

試験例

(RAの発症抑制及び治療効果)BA/1JマウスにII型コラーゲンを免疫することによって発症するコラーゲン誘導関節炎(collagen type II、以下CIAと略す)の系を評価系として使用した(Trentham D.E., et al., J.Exp.M ed., 146, p. 857-868(1977))。発症一週間前にPBSに溶

解し希釈したSEBを1 μ g/マウス/日の投与量で連続して3~4週間の間経口的に投与し、対象としてはPBSのみ投与した実験群(非投与群)を設定した。関節炎はその重症度に応じて1~4度のスコア(関節炎スコア)で評価した。結果は関節炎のスコアをSEB投与群の平均と非投与群の平均とで比較し、ウィルコクソンの検定法を用いて検定し有意差があるかどうか検討した。

【0019】その結果、SEB非投与群では発症率は100%であったが、SEB投与群では発症率は20%程度であり、この差は有意であった(P<0.01)。また発

症した個体間で重症度(合計関節炎スコアを発症個体数で割った値)を比較したところ、SEB投与群が非投与群に比べて低く、たとえ発症しても症状は軽度であることが判明した。また、CIAが発症した時にSEBを1 μ gの投与量で1日1回90日間連続して経口的に投与しCIAが治癒するかどうか検討した。その結果、関節炎のスコアでみたCIAの症状はCIAの2回目の免疫から21日目においてSEB投与群は非投与群と比べて低い関節炎スコアを示し、しかもその差は統計学的に有意であった(P<0.01)。これらの結果は、SEBを前も

って経口投与することによりV β 8TCR陽性T細胞にトレランスが誘導され、その結果発症が抑制されることを意味し、疾患の発症が予防されたことが明らかとなった。さらにCIAが発症してからSEBの経口投与を開始しても症状の軽減が観られるので、SEBを本態とする薬剤の経口投与でCIAを治癒させることが可能である。

【0020】一方、予めC57BL/6マウスにSEBを0.2 μ g、1.0 μ g、5.0 μ gの投与量で1日1回10~20日間経口的に投与し、さらに7~10日間飼育することでV β 8TCRT細胞に特異的なトレランスを誘導した。その後1%の硫酸デキストランナトリウム溶液(dextran sulfate sodium salt、以下DSSと称することがある)を自由飲水投与しUCを発症させ、その症状について組織病理学的に比較した。その結果、非投与マウス及び0.2 μ g、1.0 μ gのSEB投与マウスでは全てUCが発症したが、5.0 μ g投与群では僅かに炎症の痕跡が認められたもののそれは極めて軽度であり、UCには至っていなかった。この結果は、SEBの経口投与により予めトレランスを誘導することによってUCの発症が抑制されることを示している。また、SEBの投与量は5.0 μ g/mouseに限らずこれ以上の高い投与量を用いた場合も発症抑制が可能なことは容易に推測できる。

【0021】実施例 1

(高純度SEBの調製)S. aureus 243株を4%NZアミン、0.01%塩酸チアミン、0.00005%のニコチン酸を含有する培地で、24~36時間培養した。限外濾過によって菌体を除去し濃縮した。これを出発材料とし、

液してSEBを吸着させ、0.15M NaCl溶液で洗浄した後、4MMgCl₂溶液で溶出した。得られた画分を0.15M NaCl溶液もしくは0.15M NaClを含むPBSに透析したものをSEB標品とした。このようにして得られたSEB標品は図1に示すように還元下でのSDS-PAGE、CBB染色で単一のバンドとして検出された。一方、従来の市販のSEB(Toxin Technology社製)は、SEBのバンドの他に夾雑するタンパク質のバンドが検出された。これらの夾雑タンパク質の成分については現在のところ不明であるが、これらの成分がSEBの毒性発現に関与している可能性は否定できない。

【0022】実施例 2

(SEBの経口投与によるVβ特異的免疫学的トレランスの誘導) DBA/1Jマウスに、S. aureus 243株より精製したSEBをPBSに溶解し、ゾンデを使用して1匹当たり0.2~10μgの投与量で1日1回10日~90日にわたって経口投与した。まず、投与開始後10日目にVβ8TCR陽性T細胞特異的なトレランスが誘導されるかどうか確認した。トレランスの誘導はSEBに対する増殖応答の測定、抗Vβ8TCR単クローン抗体刺激に対する応答性低下、フローサイトメトリーによるVβ8TCR陽性T細胞の増減の測定で評価した。

【0023】i) SEBに対する増殖応答の測定

SEB投与群及び非投与群から抽出したマウスから脾臓細胞を調製し、抗マウスIgM単クローン抗体及び抗マウスIgG単クローン抗体を固相化したプラスチックプレートに加え、37℃で2時間インキュベートしB細胞を除去した。残りの細胞画分はT細胞画分として以下の実験に使用した。また他のSEBを投与していない他の同系のマウスから調製した同系のマウスの脾臓細胞を細胞分裂を阻害するマイトマイシンCで処理し、抗原提示細胞として使用した。5x10⁵個マイトマイシンC処理脾臓細胞を96穴のマイクロプレートに加えた。この時、刺激物質としてSEBを段階希釈して、37℃、66時間インキュベートし66時間目に細胞をトリチウムチミジンで37℃、6時間でラベル(0.5μCi/well)した。ラベル後、セルハーベスターで細胞を収穫し、液体シンチレーションカウンターで細胞に取り込まれた放射性活性を測定した。なお、培養には刺激物質の対象としてSEA(Staphylococcal enterotoxin A)に対する増殖応答を観るウェルも設定した。

【0024】このようにしてSEBに対する増殖応答を、SEB経口投与群と非投与群とで比較した結果、図2に示すように、測定に用いた全てのSEB濃度においてSEB投与群ではトリチウムチミジンの取り込みが非投与群に比べて著しく低下していることが判明した。このことはSEBに対する応答性が低下していることを示しており、SEB特異的なトレランスが成立している可能性が考えられた。そこで、次にSEB応答性の抗Vβ8

TCR単クローン抗体を使用して、この細胞の抗Vβ8TCR単クローン抗体に対する増殖応答が低下しているかどうか検討した。まず、予め抗体を96穴プレートに固相化し、SEB投与マウス及び非投与群から得た脾臓T細胞の懸濁液(2x10⁶/ml)を加えた。37℃で66時間インキュベートした後、前述したように[³H]-チミジンで6時間ラベルし、放射活性を比較した。その結果、図3に示されるようにSEBを経口投与した群では非投与群に比べて取り込まれた[³H]-チミジンの放射活性が低く、抗Vβ8TCR単クローン抗体刺激に低応答性であることが判った。即ち、Vβ8TCRT細胞が部分的なアナジーになっていることが判明した。

【0025】ii) フローサイトメトリー解析によるclonal deletionの解析

さらに、SEB経口投与後のVβ8TCR陽性T細胞のポピュレーションの増減についてもフローサイトメトリーを用いて解析した。脾臓細胞から調製したT細胞をstaining buffer(2%ウシ血清アルブミン、0.02%アジ化ナトリウム、PBS)に10⁷個/mlで懸濁し、それぞれエッペンドルフチューブに移した。それぞれのチューブにFITCラベル抗マウスVβ8TCR単クローン抗体を1μg/mlで加え、氷中で最低30分間反応させた。反応後、staining bufferで3回洗浄し、500μg/mlのプロピジウムヨードイド(propidium iodide)溶液に懸濁してFACSscan(Becton Dickinson社製)を用いて染色度合いを解析した。結果はT細胞全体におけるそのポピュレーションの比率で表した。その結果、SEBを投与していない群由来のT細胞ではVβ8TCRT細胞が15.4%であったが、SEB経口投与群では11.0%と約30%程度低い値を示した。この結果、SEBを連続的に経口投与することによりSEB応答性のVβ8TCRT細胞が部分的に減少すること、即ちclonal deletionが認められることが判明した。これらの結果から、SEBを連続的に経口投与することによりVβ8TCRT細胞の不应答性によるSEB特異的なアナジーとVβ8TCRT細胞の部分的なclonal deletionによるトレランスの誘導が成立していることが示された。

【0026】実施例 3

(SEB経口投与によるCIAの発症抑制) 6~16週齢のDBA/1J雌のマウスに0.15MのNaClを含む50mMトリス塩酸(pH8.0)に溶解したウシII型コラーゲン(CII、ヤガイ中央研究所社製)をフロイント完全アジュバント(Freund Complete Adjuvant、以下FCAと称することがある)でエマルジョン化し、1匹当たり200μgの投与量で背部に皮内投与した。その3週後にCII200μgを溶液状態のまま腹腔内に投与した。以後1週~3カ月間飼育することでコラーゲン誘導関節炎(collagen induced arthritis、以下CIAと称することがある)が発症した。CIAの評価については、CIIを腹腔内投与した後1週後に四肢の指の関節から発症

10

20

30

40

50

し始め、10～14日目にほぼ100%のマウスが発症した。CIAの評価は、四肢の関節の関節炎を重症度に応じて1～4点でスコア化することにより行なった。最初の投与から約4週後にヒトのRA様の症状を呈するようになり、その後の重症度は次第に増加していった。この時、マウスにSEBを予め経口投与してVβ8TCRT細胞にトレランスを誘導しておいた実験群では発症率は極めて低く全体の約20%であった。これに比べてSEB非投与群では発症率は100%であったので、SEBの経口投与により、明らかにCIAの発症が抑制されていることが示された(図4)。

【0027】実施例 4

(SEBの経口投与によるCIAの治療効果) 先ず、DBA/1JマウスにCIIを二度免疫してさらにブースター免疫を行ないCIAを発症させた。最後の免疫から1週後よりSEBを1μg/マウスの投与量で0.2ml/マウスで1日1回連続90日間経口的に投与した。関節炎スコアの変化を、経時的な臨床スコア測定による評価あるいは病理標本作製・鏡検による評価を行なった。その結果、SEB非投与群では1匹当たりの関節炎のスコアは高いまま90日目まで維持され疾患が持続していることが示された。一方、SEBを経口的に90日間連続投与した場合の関節炎スコアは、投与後3週目頃から徐々に下がり始め90日目にはほぼ0に近い値を示した(図5)。このことは、CIAを一旦発症させた後でもSEBを経口的に連続して長期間投与し続けることにより関節炎が改善できること、即ち治療できることを示唆している。しかも、この時使用したSEBの投与量は1μg/マウスと低く動物に病原性をもたらすような量ではないことから、安全で経済的な量であると言える。以上のように、本発明によってもたらされる高純度のSEB本態とする経口投与用薬剤を1μg/マウス/日の低投与量で長期間投与することにより、ヒトの慢性関節リウマチのモデルであるCIAを治療することが可能であることが明らかになった。また0.1μg/マウス/日の経口投与でもVβ8TCRT陽性T細胞特異的なトレランスが誘導されることが示されているのでこの投与量でもCIAの治療が可能であることが推測される。

【0028】実施例 5

(DSS誘導UCの発症) 前述したように6～16週齢のC57BL/6マウスにM.W. 40,000の硫酸デキストランナトリウム(Dextran Sulfate Sodium salts, 以下DSSと称することがある)を、1%の濃度で自由飲水投与しながら7～10日間飼育することで、大腸に慢性的な炎症を発症する炎症性大腸炎モデルをUCのモデルとして適用した(Gastroenterology, 98:p.694-702, (1990))。飲水投与開始後10日目に飲水投与を終了し、水のみを引き続き14日～20日間投与した。経時的に、マウスから大腸を切除し平滑筋の方向に沿って切開し、ピンで数カ所をゴム製シートに固定し、そのまま5%中

性ホルマリン液に浸すことで組織を固定した。その後、組織をエチルアルコール処理により脱水し、パラフィンブロックに包埋した後、ミクロトームで約10mmの厚さに切断した後、スライドガラスに貼り付け、ヘマトキシリン-エオジン染色を行なった。染色後、それぞれを光学顕微鏡で鏡検し、各実験群での差異を調べた。

【0029】i) 経口投与によるトレランスの誘導

C57BL/6マウスは、通常、スーパー抗原に対する応答性が低い。そこでまずSEBの連続的な経口投与によるVβ8TCRT特異的なトレランスが誘導されるかどうかを調べた。DBA/1Jマウスの場合より高い投与量(5μg/マウス)で1日1回、14日間にわたって投与した。最終投与から14日目にマウスから脾臓を摘出し、実施例2の項で述べた方法に従いT細胞を調製し、同様に同系の正常マウスの脾臓細胞をMMC処理して抗原提示細胞とした。これらの細胞を使用してSEBに対する応答性及び抗Vβ8TCRTモノクローナル抗体刺激に対する増殖応答を測定した。その結果、図6に示すように、SEBに対する増殖応答及び抗Vβ8TCRTモノクローナル抗体に対する増殖応答ともSEBを投与していない正常マウスのそれと比べて有意に低下しており、Vβ8TCRT細胞特異的なトレランスが誘導されていることが示された。

【0030】ii) SEBの経口投与によるUCの発症抑制

先ず、DBA/1Jマウスに予めPBSに溶解したSEBを5μg/マウス/日の投与量で最低10日間経口投与を行ないトレランスを誘導した。またPBSのみ投与した実験群を設定し陽性対象とし、続いて1.0%DSSを10日間自由飲水投与してUCの発症が抑制されるかどうか調べた。なお、SEB及びDSSの非投与群を設定し陰性対象とした。DSS投与終了後18日目にマウスを解剖して大腸を摘出し、ヘマトキシリン-エオジン染色で病理切片を作製し、大腸の病変について各実験群で比較検討した。その結果、図7に示すように陽性対照群では大腸粘膜上皮の剥離、脱落及び細胞浸潤を伴う大腸炎が認められ、病変のステージは極期を過ぎ修復期に入った状態であった。一方、5μg/マウス/日の投与量でSEBを経口投与されたマウスでは、直腸上部に炎症像はあるものの他に比べて明らかに軽度であり、陰性対照群の像に近い検鏡像であった。以上のように、SEBを予め経口投与してVβ8TCRT細胞にトレランスを誘導することにより、DSS誘導UCの発症を抑制できることが明らかになった。

【0031】これらの結果より、本願発明のもしくはその誘導体を本態とするによりトレランスを誘導し、CIA及びUCの発症を抑制できるということ、またCIAを治療できるということは、同様の方法がヒトの慢性関節リウマチ及び潰瘍性大腸炎或いはこれに類似するクローン病の予防及び治療に適用できることを示している。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本願発明に用いられるSEBの精製方法とそれによって得られたSEBの純度の上昇を示す電気泳動図(図面代用写真)である。

【図 2】 本願発明に用いられるSEBの経口投与後のマウス脾臓T細胞のSEBに対する増殖応答の低下を示す図である。

【図 3】 本願発明に用いられるSEB経口投与後のマウス脾臓T細胞の抗 β 8TCR単クローン抗体に対する増殖応答の低下を示す図である。

【図 4】 本願発明に用いられるSEBの経口投与後のCIAの発症抑制を示す図である。

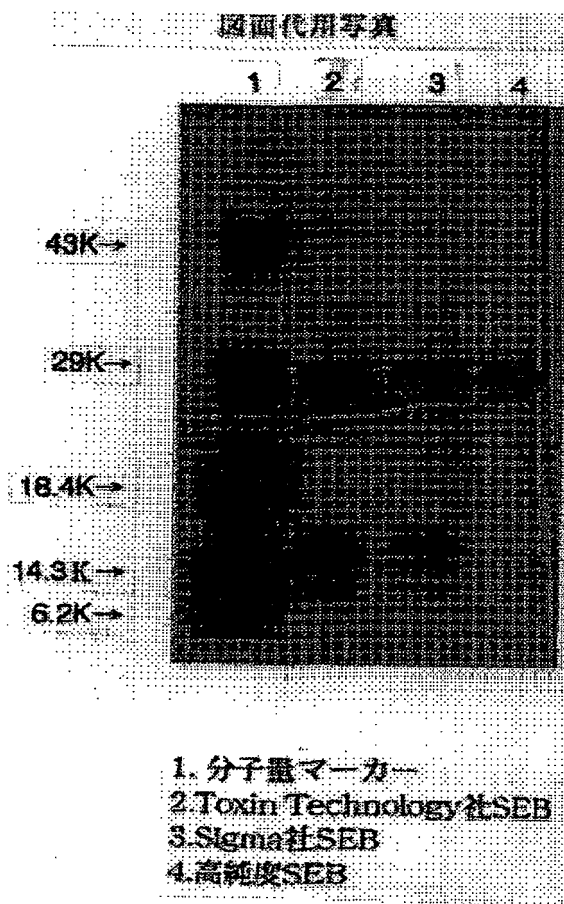
【図 5】 本願発明に用いられるSEBの経口投与によるCIAの治療効果を示す図である。

【図 6】 C57BL/6マウス脾臓T細胞での本願発明の免疫異常性疾患予防治療用経口投与剤投与に伴うSEBに対する増殖応答の低下を示す図である。

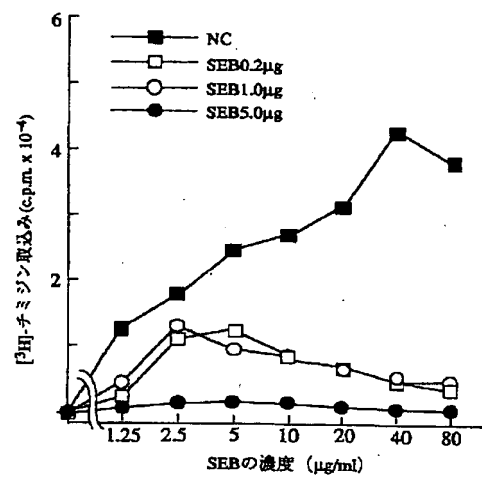
【図 7】 本願発明の免疫異常性疾患予防予防治療用経口投与剤投与後のDSS誘導UCの発症抑制を示す生物(病理切片)の形態図(図面代用写真)である。

10

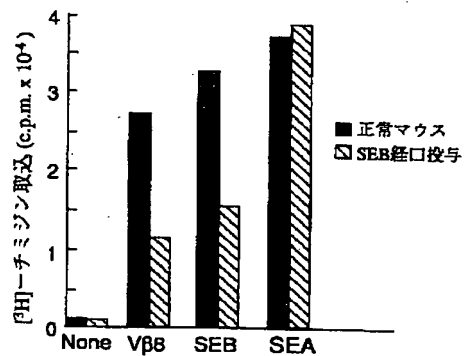
【図 1】



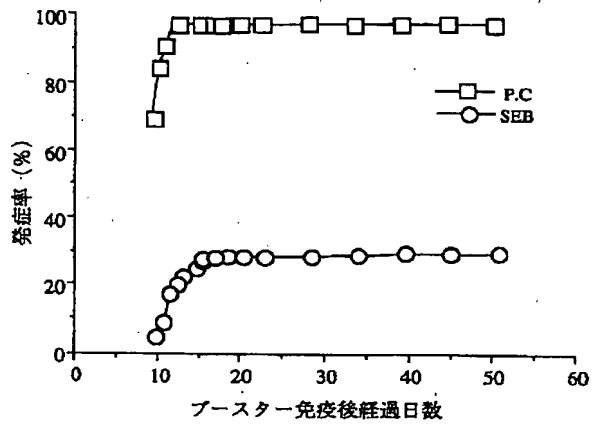
【図 2】



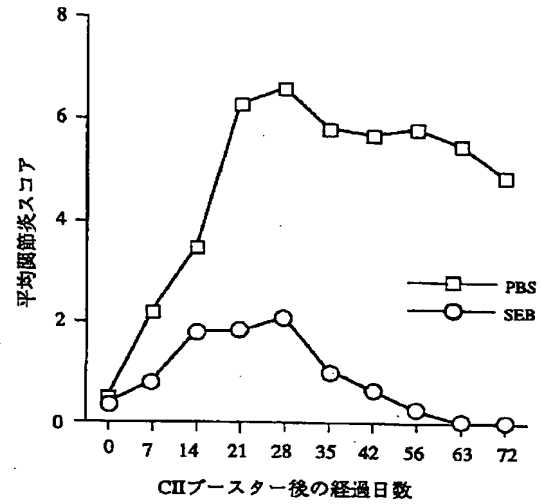
【図 3】



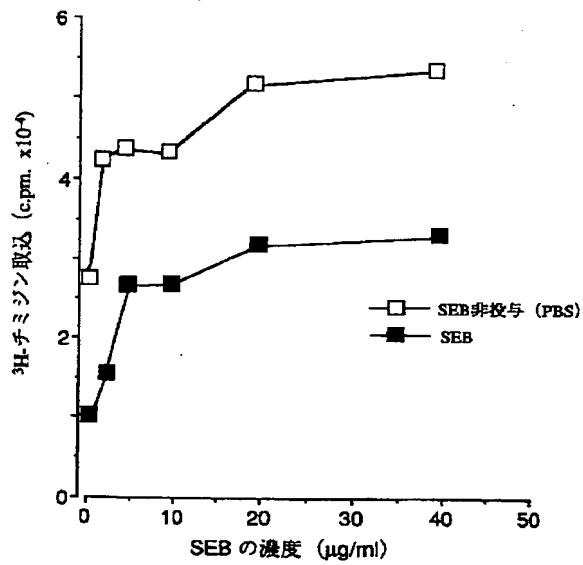
【図4】



【図5】

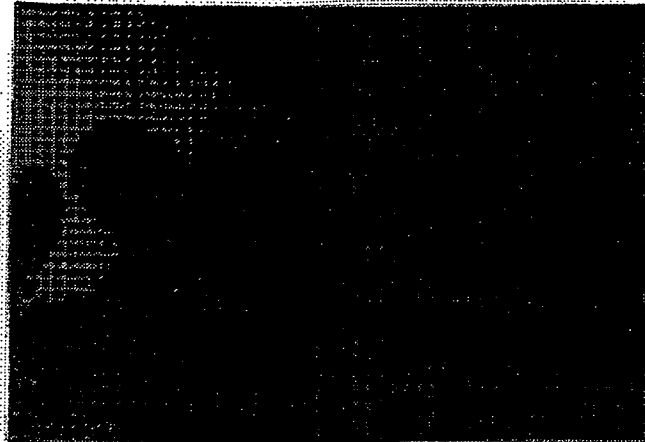


【図6】

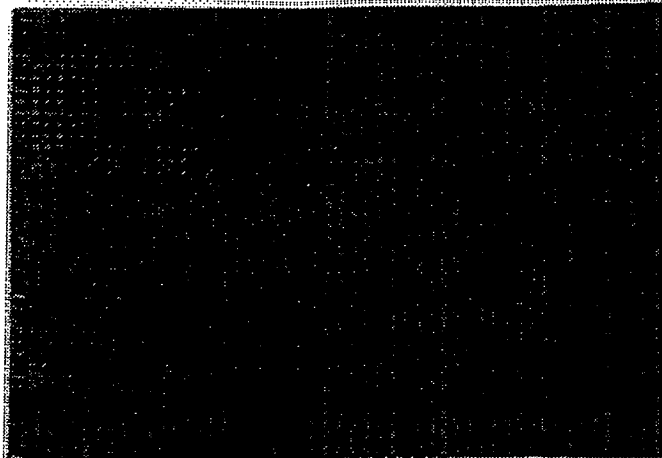


【図7】

図面代用写真



正常マウス大腸



UC発症マウス大腸

本願予防治療用経口投
与剤(SEB 5 μ g)投
与マウス大腸

フロントページの続き

(72) 発明者 今川 義孝
熊本県熊本市東町4丁目16番2棟205号

(72) 発明者 時吉 幸男
熊本県熊本市若葉3丁目14-19